AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER
UNIVERSITÄT BASEL
(Vorsteher: Prof. Dr. J. Tomcsik)

Über das physikalisch-chemische Verhalten von Forssman- und Mononukleose-Antigen in den Hammelblut-Stromata

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Hans Schwarzweiss

aus Luckenwalde

BUCHDRUCKEREI BRIN AG. · BASEL · 1948

Von der medizinischen Fakultät der Universität Basel
genehmigt auf Antrag von
Herrn Professor Dr. J. Tomcsik

Tag der Promotion: 1. Juni 1948

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ueber das physikalisch-chemische Verhalten von Forssman- und Mononukleose-Antigen in den Hammelblutstromata.*)

Von Hans Schwarzweiss.

Um die Jahrhundertwende erkannte die Chemie die Grundprinzipien im Aufbau der biogenen Stoffe. Durch seine klassischen Synthesen von Zuckern und Polypeptiden machte *E. Fischer* den Weg frei zur biochemischen Forschung.

Die serologische Forschung ging zunächst eigene Wege. Der Begriff der „Spezifität" der Antikörper beherrschte das Feld, wobei man unter Spezifität meistens die Artspezifität verstanden hat. Die Wissenschaft beschäftigte sich in der Hauptsache mit der Durchforschung der Natur nach antigenfähigen Stoffen, d.h. nach Substanzen, die dem Tier parenteral appliziert, spezifische Antikörperbildung hervorrufen. Spezielles Interesse zeigte man für die Antikörper gegen Bakterien und deren Toxine. Man war der Auffassung, dass durch Erzeugen von Antikörpern sichere Immunität gegen jegliche Infektionen zu erzielen wäre.

Eine bildhafte Vorstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion entwickelte *P. Ehrlich* in seiner Seitenkettentheorie, in der bereits eine chemische Deutung der Reaktion angestrebt wurde, denn mit der Seitenkette meinte *Ehrlich* nichts anderes als die Seitenkette einer aromatischen Verbindung.

Erst *H. G. Wells* richtete 1924 durch eine zusammenfassende Arbeit das Interesse auf die chemische Natur der Antigene und öffnete das Gebiet für die biologische und biochemische Forschung.

Wells (1927) schreibt u. a.: „Zum grössten Teil sind antigene Stoffe Proteïne. Zurzeit ist nicht überzeugend festgestellt, dass irgend etwas ausser Proteïnen jemals echte antigene Wirksamkeit zeigt und zur Bildung spezifischer Antikörper führt". 1902 fanden *Pick* in Typhuskulturen, 1923 *Zinsser* und *Parker* bei Pneumococcen, Influenzabazillen und Staphylococcen, im gleichen Jahr *Heidelberger* und *Avery* bei Pneumococcen, Friedländerschen Pneumobazillen und Streptococcus viridans, 1924 *Mueller* und *Tomcsik* in Hefe einen Stoff, der keine Eiweissreaktion gab und doch spezifisch mit dem entsprechenden Antiserum reagierte. Die aufgezählten Präparate sind in Alkohol und Äther unlöslich und werden von proteolytischen Fermenten nicht angegriffen, so dass sie mit grosser Wahrscheinlichkeit der Gruppe der Polysaccharide zugeordnet werden können. Alle diese Substanzen haben aber nicht die Fähigkeit, durch parenterale Injektion Antikörperbildung hervorzurufen, und deshalb bezeichnet sie auch *Wells* mit dem von *Landsteiner* geprägten Ausdruck „Haptene".

*) Mit Unterstützung der Roche-Studien-Stiftung, Basel.

Landsteiner konnte 1919/1920 mit einfachen, mit besonders stickstoffhaltigen Radikalen verbundenen Proteïnen bei Tieren Antikörper herstellen, die die Präcipitinreaktion gaben; aber die Reaktion trat bei Verwendung des gleichen Serums auch mit anderen Proteïnen ein, die chemisch gleichartig vorbehandelt waren. Azotierte Albumosen gaben schwache Präcipitinreaktion, azotierte Peptone und Aminosäuren überhaupt keine. Trotzdem tritt Bindung der Antikörper ein, da die Seren nach dieser Vorbehandlung mit präcipitablen Antigenen keine Präcipitinreaktion zeigen. Es handelt sich dabei stets um kleine Moleküle, die diese Hemmungsreaktion veranlassen. Diese hemmenden Substanzen enthalten genau die gleiche, spezifische Gruppe wie das mit dem Immunserum reagierende Proteïn und zeigen die gleiche spezifische Reaktion. So kommt *Wells* zu dem Schluss: „Solche einfachen Radikale. ... zeigen ein Attribut eines Antigens, nämlich spezifisch mit Antikörpern zu reagieren, aber diese Qualität macht an sich nicht ein Antigen aus. Es ist das grosse kolloidale Molekül der Proteïne erforderlich, um die Bildung spezifischer Antikörper anzuregen ...". Solche kleinen Radikale aber bezeichnet *Wells* als Haptene. Nach *Landsteiner* allerdings ist ein nichtproteïner, antigener Komplex möglich.

Durch die „Schleppertheorie" von *H. Sachs* (1928/1929) wurden die Versuche von *Landsteiner* (1921) und von *Doerr* und *Hallauer* (1926), die zeigten, dass durch Zusatz von Proteïnen zu den Haptenen wieder Vollantigene entstehen, zusammengefasst und formuliert. Damit ist eigentlich der strenge Unterschied zwischen Hapten und Antigen gefallen, und damit ist die Frage, ob ein Polysaccharid ein Antigen oder Hapten ist, in ein sekundäres Licht gerückt. Sicherlich kann das Polysaccharid in einem Antigenkomplex die spezifische Gruppe darstellen, während das Proteïn eben nur die „Schleppersubstanz" ist.

Einen anderen Markstein in der Geschichte der Antigenforschung ist die Entdeckung des, heute in der serologischen Literatur unter dem Namen „Forssman-Antigen" bekannten, heterogenetischen Antigens (1911). Es war überraschend, dass man mit den Organen eines bestimmten Tierkreises, z. B. mit Nieren von Meerschweinchen oder Pferden in Kaninchen Hammelhämolysine erzeugen konnte.

Nachdem *Wells* und *Landsteiner* durch ihre künstlichen Antigene (Azoproteïne) das Augenmerk in die Richtung der chemischen Charakterisierung der Antigene gelenkt haben, konnte eigentlich erst die wissenschaftliche Forschung einsetzen.

In erster Linie galt das Interesse den menschlichen Blutgruppenmerkmalen. *Schiff* (1924), *Schiff* und *Adelsberger* (1924) und *Brahn* und *Schiff* (1926, 1929) haben auf die Verwandtschaft der A-Substanz mit dem Forssman-Antigen hingewiesen und damit die A-Substanz zu einem heterogenetischen Antigen gestempelt. Ferner haben *Brahn* und *Schiff* (1926) bereits versucht, durch alkoholische Extraktion

eine Fraktionierung der A-Substanz zu erreichen. Sie erhalten eine alkohollösliche (Lipoid) Fraktion und eine unlösliche (Proteïn) Fraktion; beide waren aktiv. *Witebsky* (1926/1927) glaubt ebenfalls, dass die aktiven Substanzen in der alkoholischen Fraktion aus Lipoiden bestehen. *Hallauer* hat sich in einigen Publikationen (1929, 1932, 1934) mit der A-Substanz beschäftigt. Er konnte die A-Substanz durch Waschen mit Wasser aus den Erythrocyten herauslösen und zwar besonders leicht, wenn die Erythrocyten vorher mit Alkohol extrahiert worden sind. Die Aktivität der erhaltenen A-Substanz betrug 2,5—0,5 gamma, für die B-Substanz, für die er analoge Versuche ausführte, 1.0—0,25 gamma. Seine Substanzen waren wasserlöslich, unlöslich in Alkohol, Aether, Aceton und kaltem Benzol. Eiweiss konnte nicht nachgewiesen werden, dagegen gaben die Substanzen nach 1stündiger Hydrolyse deutliche Molisch- und positive Fehling'sche Reaktion. Die Elementaranalyse zeigte, dass die Stoffe Phosphor, Schwefel und Stickstoff enthalten. *Ottensooser* (1932) erkannte, dass die A-Substanz sich in den Stromata der Blutkörperchen befindet und konnte sie noch in 1,3 gamma nachweisen.

Mit den Arbeiten von *Freudenberg* (1932) und Mitarbeitern schliesst eine Periode der wissenschaftlichen Forschung über die A-Substanz ab. Sie konnten aus Urin die A-Substanz isolieren, die serologisch noch in 1/50 gamma aktiv war, und sich als Eiweiss-, Lipoid- und Asche-frei zeigte. Der Kohlenstoff-Wasserstoff-Gehalt wies in die Gruppe der Polysaccharide; 4-5 % Stickstoff scheinen der Substanz eigentümlich zu sein. Sie dreht polarisiertes Licht nach links. Nach Kochen mit Säure wird Fehling'sche Lösung reduziert. Damit ist die A-Substanz genügend charakterisiert.

Gleichzeitig aber beginnt mit den Arbeiten von *Freudenberg* eine neue Forschungsperiode. Nachdem *Brahn* und *Schiff* (1929) bereits im Speichel und im Urin die A-Substanz nachgewiesen haben, folgen nunmehr Arbeiten,die die A-Substanz auch ausserhalb des menschlichen Organismus erfassen: *Landsteiner* im Pferdespeichel (1932, 1936), *Brahn, Schiff* und *Weinmann* im Pepsin des Handels (1932), *Landsteiner* und *Chase* ebenfalls im Handels-Pepsin (1936), *Goebel* im Handels-Pepton (1938), *Freudenberg* und *Westphal* im „Witte-Pepsin" (1938), *Landsteiner* und *Harte* im Schweinemagen (1940), *King* und Morgan in Ovarialcysten (1944), *Oliver* und *Gonzalez* in ascaris suum (1944) und Jorpes und Thanning im Rindermagen (1945). Durch obige Arbeiten ist die A-Substanz mit Sicherheit zu den heterogenetischen Antigenen zu zählen.

Aus den Elementaranalysen, die diese Forscher angeben, geht hervor, dass es sich um ein Polysaccharid handelt. Allerdings ist der Stickstoffgehalt, der zwischen 5,4 und 7 % liegt, etwas hoch und lässt auf Besonderheiten der Verbindung schliessen. Die Aktivität der Präparate bewegt sich in den Grenzen von 0,1—0,00006 gamma.

Das Molekulargewicht beträgt nach Schätzung 70000 (*Landsteiner* und *Harte*), 1000 nach *Freudenberg*. Unter den sicher nachgewiesenen Bausteinen geben die Autoren an: einfache Zucker, acetylierte Zucker und Glukosamin. Nach *Landsteiner* und *Harte* verteilt sich der Stickstoffgehalt der A-Substanz zu 42 % auf Glukosamin, 53,6 % auf Aminosäuren, von denen Arginin, Histidin, Alanin mit Sicherheit nachgewiesen wurden. Die Aminosäuren sind wahrscheinlich in der A-Substanz polypeptidartig miteinander verkoppelt.

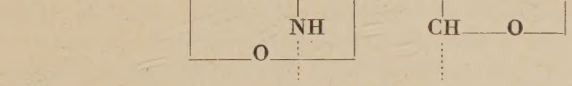
Jorpes und *Thanning* (1945) haben die A-Substanz aus menschlichem Urin in zwei Fraktionen zerlegt. Die eine Fraktion, die in Eisessig und Ammonsulfat unlöslich ist, betrachten sie als Proteïn, da die Aktivität durch das Ferment Papayotin und durch n/2 Natriumhydroxyd zerstört wird, die andere soll wegen ihrer Resistenz gegen diese Reagentien Kohlehydrat-ähnlich sein. Die Eiweissfraktion neutralisiert die *a*-Agglutinine des normalen, menschlichen Serums der Blutgruppe B, die Kohlehydratfraktion sowohl die *a*-Agglutinine wie auch die Schafhämolysine. Die Autoren glauben, dass der A-Rezeptor, wie er in der Literatur beschrieben wird, nicht als Polysaccharid zu betrachten ist, sondern als ein Komplex, der eine Proteïn-Komponente enthält.

Kabat, Bendich, Bezer und *Beiser* zeigen in ihren immunochemischen Studien, dass gereinigte A-Substanz von verschiedenen Quellen stets ähnlich im Stickstoff-, Glukosamin- und reduzierndem Zuckergehalt ist. Menschliche A-Substanz ist links-, A-Substanz aus Schweinemagen rechtsdrehend. Mit Anti-A-Serum, das die Autoren durch Immunisierung von Menschen mit A-Substanz aus Schweinemagen erhalten, konnten sie ihre Präparate präcipitieren nnd zeigen, dass bei den reinsten Präparaten mit der besten Aktivität fast das gesamte Glukosamin bei Antikörperüberschuss spezifisch präcipitiert wird. Das würde im Gegensatz zu den Ansichten von *Jorpes* und *Thanning* stehen, denn man könnte zu dem Schluss kommen, dass die A-Substanz ein Polysaccharid darstellt, in dem die Glukosaminmoleküle glukosidartig durch wechselseitiges Ineinandergreifen der Aldehyd-(glykosidische Hydroxylgruppe) und Aminogruppe wie im Chitin verbunden sind, da ohne Hydrolyse keine Reduktionsfähigkeit vorhanden ist. Dadurch, dass die Zahl der Aminogruppen im Glukose-Molekül, entsprechend den freien Hydroxylgruppen variieren können, wären die Schwankungen im Stickstoffgehalt der A-Substanz zu erklären.

Die Frage die *Tomcsik* aufwirft, ob es sich bei der A-Substanz um ein Polysaccharid oder Glykoproteïd handelt, ist einstweilen nicht zu entscheiden, denn aus den Differenzen in der Aktivität und dem Molekulargewicht geht hervor, dass es fraglich ist, ob überhaupt die Aminosäuren zum A-Hapten-Komplex gehören. Wäre die Zugehörigkeit sicher gestellt, so könnte nur die chemische Konstitutionsaufklärung entscheidend für die Nomenklatur sein: Ist die Polypeptidkette an

einem glykosidischen Hydroxyl gebunden, so liegt ein Glykosid vor, tritt die Bindung an einem anderen Hydroxyl ein so liegt ein Proteïd vor. Nur dann ist der Name Polysaccharid gerechtfertigt, wenn der Gesamtstickstoff in Form von Glukosamin vorhanden ist und Aminosäuren nicht zum Komplex gehören.

Landsteiner und *Harte* konnten unter den Spaltprodukten der A-Substanz keine Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin nachweisen. Das spricht dafür, dass im Komplex kein Benzolringsystem präformiert ist. Die wie erwähnt sicher nachgewiesenen Aminosäuren Arginin, Histidin, Alanin könnten bei der hydrolytischen Spaltung des Glykosamin-Komplexes entstehen, ohne dass ein Proteïn im Gesamt-Komplex vorhanden sein muss. Für den Fall des Histidins ist zu erwähnen, dass nach *Windaus* und *Knoop* bei alkalischer Hydrolyse von Zucker Formaldehyd und Methylglyoxal entstehen, die mit Ammoniak 4-Methylimidazol liefern, ein Stoff, der dem Histidin nahe verwandt ist. Bei der Betrachtung der Chitin-Formel:



findet man die Kette .NH. CH. CH. NH. CH., die bereits eine Ähnlichkeit mit dem Ringsystem des Imidazols besitzt. Damit ist nicht gesagt, dass die A-Substanz nach dem Muster des Chitins aufgebaut ist, denn für die Verbindung vieler Glukosaminmoleküle gibt es viele Möglichkeiten. Die Entstehung obiger Aminosäuren gibt Anlass, einen neuen Typ von Polysaccharid-Verbindungen anzunehmen. Diese Vermutung hat bereits *Tomcsik* auf Grund der Tatsache ausgesprochen, dass Glykoproteïde nur 15-20 % Polysaccharide enthalten, während die A-Substanz 70 % enthält.

Über die B-Substanz der menschlichen Erythrocyten existieren ebenfalls eine Anzahl Publikationen. *Friedenreich* und *Witt* z. B. zeigen, dass das B-Merkmal auch heterogenetisch ist, *Witebsky* und *Klendshoj* haben die B-Substanz als Kohlehydrat-ähnlich beschrieben und zeigten, dass sie so aktiv wie die A-Substanz aus Pepton ist.

Trotz der gründlichen wissenschaftlichen Forschung ist es jedoch bisher nicht gelungen, die Unterschiede zwischen A- und B-Substanz, die physikalisch und chemisch ausserordentlich ähnlich sind, experimentell zu demonstrieren und die Spezifität der serologischen Reaktionen zu erklären.

Die Forschung auf dem Gebiet des Forssman-Antigens war nicht so rege, wie auf dem Gebiet der menschlichen Gruppenmerkmale. *Doerr* und *Pick* zeigten zuerst, später *Georgi*, *Friedberger* und *Sordelli*, dass die aktive Substanz in Alkohol löslich ist. Die mittels organischer Lösungsmittel gereinigten Präparate wurden als Lipoïde betrachtet, ähnlich wie auch zuerst die A-Substanz (*Brahn* und *Schiff*). Wie bereits

erwähnt, hatten Bakteriologen aus Mikroorganismen Haptene hergestellt, die Polysaccharid-Charakter zeigten. *Landsteiner* und *Levine* haben eine proteïn- und lipoidfreie Substanz gewonnen mit 28% reduzierenden Stoffen nach Hydrolyse. Sie war in Alkohol, Aceton, Äther und Chloroform unlöslich, nach langem Schütteln aber leicht in Alkohol löslich. *Brunius* hat in seiner Monographie (1936) über das Forssman-Antigen die Angaben geprüft und die Kenntnis dieses Antigens noch erweitert. Er konnte aus Pferdeniere eine Substanz herstellen, die nach Hydrolyse Hexosamin sowie Fettsäuren lieferte. 1942 haben *Renaux* und *Thomas* Forssman-Antigen aus Pferdenieren isoliert und geben an, im Besitz eines polysaccharid-freien „Lipoids" gewesen zu sein. *Tomcsik* führt die Aktivität dieses „Lipoid-Präparates" auf geringe Polysaccharid-Verunreinigungen zurück. Weiter gehen *Tomcsik* und *Fischer*, die durch ein Reinigungsverfahren nach Verseifung der Lipoide Forssman-Antigen mit einer Aktivität von 0,6 gamma herstellen. Sie widerlegen gleichzeitig die Theorie von *Renaux* und *Thomas*, die eine Multiplizität im Vorkommen des Forssman-Antigens bei verschiedenen Tieren annehmen wollen. Endlich können sie zeigen, dass die Aktivität steigt parallel mit der Erhöhung des Gehaltes an reduzierenden Substanzen, die sie durch Hydrolyse ihres Präparates nach *Hagedorn-Jensen* bestimmen. Damit ist entschieden, dass das Forssman-Antigen betreffs Einordnung in eine chemische Körperklasse zumindest dieselben Probleme aufwirft, wie die A-Substanz.

Obwohl das Mononukleose-Antigen in den Hammelerythrocyten als diagnostisches Reagens bei der Paul-Bunnel'schen Reaktion benutzt wird, sind über dieses Antigen nur wenige Angaben in der Literatur zu finden.

Tomcsik und *Schwarzweiss* konnten das Mononukleose-Antigen qualitativ vom Forssman-Antigen trennen, da nämlich das Forssman-Antigen in Alkohol und Pyridin bei Zimmertemperatur löslich ist, während das Mononukleose-Antigen in den Stromata der Hammel-Erythrocyten zurückbleibt. Auch das Mononukleose-Antigen scheint zu den heterogenetischen Antigenen zu gehören, denn *Stuart*, *Griffin*, *Wheeler* und *Battey* haben festgestellt, dass in Rinder-Erythrocyten ein gegen Mononukleose-Serum spezifisch gerichtetes thermostabiles Antigen vorhanden ist. Die Thermostabilität lässt vermuten, dass es sich auch hier nicht um ein Proteïn handelt.

Die vorliegende, experimentelle Arbeit hat den Zweck, die Vorbedingungen zu studieren, die eine spätere Isolierung des Mononukleose-Antigens und die Trennung vom Forssman-Antigen zum Ziel haben.

Experimenteller Teil

Methodik

Zum Nachweis der Antigene in dem Ausgangsmaterial, in den Stromata, und in den angefertigten Präparaten dient folgende serologische Methode: Als Indikatoren dienten 2 Seren: Serum von Patienten mit infektiöser Mononukleose (= Mononukleose-Serum) und Kaninchen-Meerschweinchenniere-Immunserum (= Forssman-Serum). Am Versuchstage werden diese Seren mit den zu verwendenden Hammelerythrocyten titriert. Zu 0,1 ccm Serum, das man sich in einer Verdünnungsreihe in 2er Potenzen herstellt, setzt man 0,2 ccm ca. 0,75%ige Hammelerythrocyten-Suspension in physiologischer Kochsalzlösung. Daraufhin wird 3 Min. zentrifugiert (1500 Umdrehungen pro Minute). Bei vorsichtigem Aufschütteln kann man mit blossem Auge erkennen, bis zu welcher Verdünnung eine Agglutination erfolgt und kann so den Serum-Titer bestimmen, eine Methode, die bereits in ähnlicher Form von *Glanzmann* und *Ottensooser* benutzt wurde. Von der noch stark agglutinierenden Serummenge wurde die doppelte Dosis für den Versuch ausgewählt. Für den Hauptversuch zum Antigennachweis dient die Adsorptions- resp. Hemmungstechnik. Zu 0,1 ccm Serum gibt man 0,3 Antigenverdünnung, die ebenfalls in 2er Potenzen anzufertigen ist. Die damit vorgenommene Endverdünnung des Serums muss der oben ermittelten, doppelten, noch deutlich agglutinierenden Serummenge entsprechen. Zur Inkubation lässt man das Antigen-Serum-Gemisch 1 Stunde bei Zimmertemperatur und 5 Stunden bei + 4° C stehen und schüttelt mehrmals kräftig durch. Dann zentrifugiert man das Unlösliche ab. Im Falle, dass es sich um klare Lösungen der Antigene handelt, ist das Zentrifugieren überflüssig, und man wendet eine Hemmungsreaktion an, während beim Vorhandensein von abzentrifugierbaren Partikeln eine Adsorptionstechnik benutzt wird. Von der klaren, überstehenden Flüssigkeit entnimmt man 0,1 ccm entweder mit einer gewöhnlichen Pipette oder mit einer nach Tropfen kalibrierten Kapillare. Zu dieser Serumverdünnung setzt man 0,2 ccm von der gleichen, zur Titrierung verwendeten Hammelerythrocyten-Suspension zu, zentrifugiert wie oben und liest ab. Am Ausbleiben der Agglutination erkennt man die Gegenwart des Antigens. Die Aktivitätsgrenze, die den Reinheitsgrad des Antigens erkennen lässt, kann man so bei bekannter Anfangskonzentration des Antigens ermitteln.

Herstellung der Stromata aus Erythrocyten.

Als Ausgangsmaterial für die Extraktionsversuche dienten trockene Hammelblut-Stromata.

Zur Herstellung der Stromata ist die Methode von *Jorpes* verwendbar. Während *Jorpes* mit seiner Methode die Reindarstellung des Stromaproteins bezweckt, ohne die serologischen Eigenschaften seiner Präparate näher zu prüfen, ist für diese Arbeit eine vereinfachte Methode anwendbar. Hammelerythrocyten werden durch Zentrifugation vom Serum getrennt und zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Dann wird die 10fache Menge destilliertes Wasser (berechnet auf die verwendete Vollblutmenge) zugesetzt, filtriert und eine 25fach verdünnte n-Salzsäure zugesetzt, bis das pH der Lösung 5,5 zeigt. Die ganze Prozedur ist bei etwa + 4° C auszuführen. Dann lässt man ca. 1 Stunde in der Kälte stehen. Es sedimentiert dann ein schleimiger Niederschlag. Die über-

stehende, klare Flüssigkeit wird abgehoben und der Niederschlag durch Zentrifugieren vom Rest der Lösung getrennt und bei Zimmertemperatur im Vakuum getrocknet.

Die Methode von *Boehm*, die mit Kohlensäure arbeitet und die sicher schonender als obige Methode ist, wurde nicht ausgeführt, da sie aus technischen Gründen die Darstellung grösserer Stromamengen nicht erlaubt.

Die sicherlich schonenste Methode zur Gewinnung der Stromata aus Erythrocyten ist die mit der Sharples-Superzentrifuge (ca. 25000 Umdrehungen pro Minute), da hier keine fällenden Reagentien verwendet werden. Man hämolysiert die gewaschenen Erythrocyten wie oben in der Kälte mit destilliertem Wasser und zentrifugiert. Die Durchlaufgeschwindigkeit wird so eingestellt, dass ca. 2 Liter Flüssigkeit pro Stunde die Zentrifuge passieren.

Erwähnt sei bereits hier, dass die Aktivität der nach der Sharples-Methode gewonnenen Stromata besser ist als der nach *Jorpes*, während die Ausbeuten sich umgekehrt verhalten.

Um die Unterschiede in der Aktivität und in der Ausbeute zu klären, sind folgende Versuche angestellt worden: Die rote, fast klare Flüssigkeit, die man nach der Sharples-Zentrifugation erhält, wird in zwei gleich grosse Volumina geteilt. Der eine Teil wird Seitz-filtriert, der andere nicht. Beide werden dann mit Salzsäure obiger Verdünnung auf pH 5,5 gebracht, und dann der Niederschlag abzentrifugiert und getrocknet. Ganz approximativ kann man folgende Daten auf Grund der Versuche angeben, die den Unterschied in den Ausbeuten und der Aktivität der beiden Stroma-Arten erklären (Tabelle 1).

Aus der Tabelle 1 geht hervor: Es werden bei der Jorpesschen Methode noch geringe Mengen von Substanzen mit ausgefällt, die wahrscheinlich aus Eiweisskörpern bestehen, und die serologisch fast inaktiv sind (Tabelle 1 Nr. 3). Diese setzen die Aktivität des Endproduktes etwas herab.

Tabelle 1.

Stromata-Art	Ausbeute	Aktivität
1. Sharples-Stromata	0,5 — 0,7 g/100 ccm Blut	sehr gut
2. pH 5,5 Fällung nach Sharples-Zentrifugation ohne Seitz-Filtration.	0,25 g/100 ccm Blut	mittel
3. pH 5,5 Fällung wie unter 2 nach Seitz-Filtration.	0,1 g/100 ccm Blut	fast 0
4. Jorpes Stromata	0,7 — 1,0 g/100 ccm Blut	etwas geringer als Sharples - Stromata

Bei der Sharples-Methode werden nicht alle aktiven Partikel abgeschleudert, d. h. die relativ kleineren Teilchen bleiben in der Schwebe und passieren die Zentrifuge, werden dann aber bei pH 5,5 ausgefällt (Tabelle 1 Nr. 2). Die Differenzen in der Ausbeute und in der Aktivität sind also so zu erklären. In dieser Arbeit ist hauptsächlich mit Sharples-Stromata gearbeitet worden.

Antikörper-Analyse der Indikatoren.

Um die erwähnten Seren als reine Indikatoren verwenden zu können, gelten folgende Forderungen:

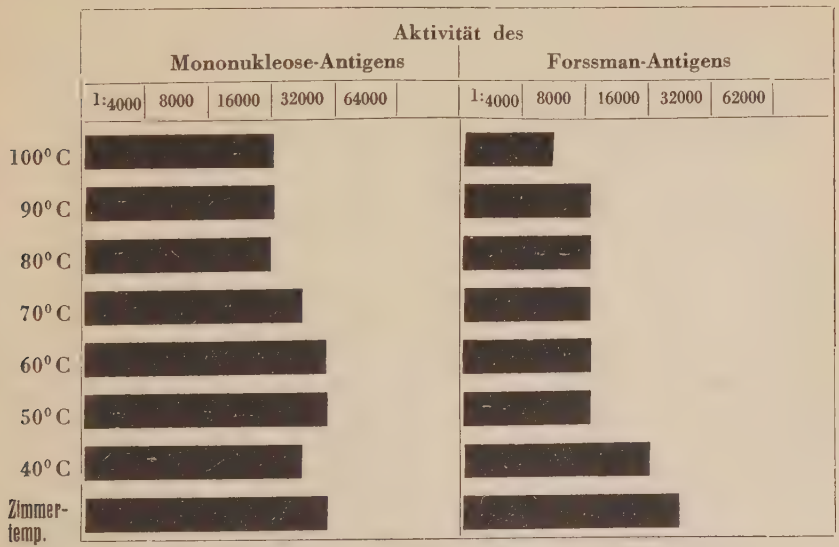
1. Das Forssman-Serum wird mit Forssman-Extrakt sowohl aus Pferde- und Meerschweinchen-Organen, ferner aus Hammelerythrocyten in der Verdünnung $1:10^4$ total adsorbiert; mit Rinder Stromata erfolgt keine Reaktion.
2. Das Mononukleose-Serum reagiert mit Rinder-Stromata noch in einer Verdünnung von $1:5 \cdot 10^4$, reagiert nicht mit Forssman-Extrakten. Dabei ist zu erwähnen, dass manche Mononukleose-Seren eine geringe Menge Forssman-Antikörper enthalten, die man zur Demonstration des reinen Mononukleose-Antikörpers mit Forssman-Antigen absättigen muss, wie es *Tomcsik* und *Schwarzweiss* in einem Fall beschrieben haben. Gelegentlich findet man aber auch natürliche, reine Mononukleose-Seren, die sich dann als Indikatoren besonders gut eignen.

Am besten informiert man sich über geringen Forssman-Antikörper-Gehalt der Seren mit der Hämolyse-Hemmungstechnik nach *Brunius*. Zu 0,5 ccm Serumverdünnung gibt man 0,5 ccm physiologischs Kochsalzlösung in einer, und 0,5 ccm Forssman-Extrakt in der Verdünnung $1:10^3$ eines aktiven Materials in einer anderen Reihe. Nach 10 Minuten Inkubationszeit setzt man zu beiden Reihen 0,25 ccm einer 2,5 %igen Hammelerythrocyten-Suspension und 0,25 ccm Komplement (frisches Meerschweinchen-Serum) 1:10 verdünnt. Der Titer-Unterschied in der Serie mit und ohne Forssman-Extrakt ist ein Mass für den Forssman-Antikörper-Gehalt des Serums.

Untersuchung der Hitze-Resistenz der Antigene.

Hammelblut-Stromata wurden in einer Verdünnung von 1:125 in physiologischer Kochsalzlösung 30 Minuten jeweils bei verschiedenen Temperaturen gehalten und dann die Aktivität gegen die beiden Seren bestimmt.

Abbildung 2.



Thermoresistenz von Mononukleose- und Forssman-Antigen in Hammelblutstromata.

Aus der Abbildung 2 ist zu erkennen, dass die Aktivitätsabnahme beim Erhitzen auf 100° C nur gering ist. Übrigens verhält sich das Mononukleose-Antigen in den Rinderblut-Stromata analog dem der Hammelblut-Stromata beim Erhitzen.

Extraktion von Hammelblut-Stromata mit organischen Lösungsmitteln.

Die Extraktionen wurden folgendermassen ausgeführt: 0,2 g Stromata und 10 ccm Lösungsmittel wurden verwendet und durch ständiges Rühren für gute mechanische Durchmischung gesorgt.

Tabelle 3.

Lösungsmittel	Aktivität des Mononukleose-Antigens in Stromata	Extrakt	Aktivität des Forssman-Antigens in Stromata	Extrakt
Aceton	1:10 000	0	1:10 000	0
Alkohol	1: 1000	0	0	1:10 000
n-Propylalkohol	1: 8000	0	0	1: 4000
iso-Propylalkohol	1:24 000	0	1: 500	1: 8000
iso Butylalkohol	1:12 000	0	1: 250	1: 8000
Aether	1:16 000	0	1: 4000	1: 1000
Petroläther	1:12 000	0	1: 8000	1: 2000
Dioxan (reinst)	1:12 000	0	1: 2000	1: 4000
Pyridin	1: 2000	0	0	1:32 000
Chloroform	1: 2000	0	0	1: 3000

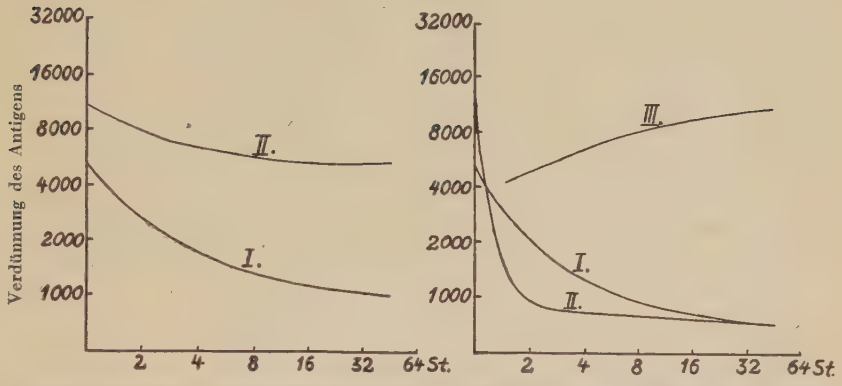
Die Aktivität des Ausgangsmaterials ist aus Tabelle 2 ersichtlich; die Extraktionen in Tabelle 3 wurden bei Temperaturen im Bereich von 20 - 40° C ausgeführt. Die Aktivität ist ausgedrückt durch die Verdünnung der trockenen Hammelblut-Stromata.

Wie bereits *Tomcsik* und *Schwarzweiss* mitgeteilt haben und wie aus Tabelle 3 hervorgeht, kann man eine qualitative Trennung des Mononukleose- und des Forssman-Antigens mit Alkohol und Pyridin erreichen; ausserdem ist das mit n-Propylalkohol und Chloroform möglich. Allerdings wird dabei die Aktivität des Mononukleose-Antigens, das in den Stromata zurückbleibt, herabgesetzt. Eine Lösung des Mononukleose-Antigens wurde bisher nicht erreicht.

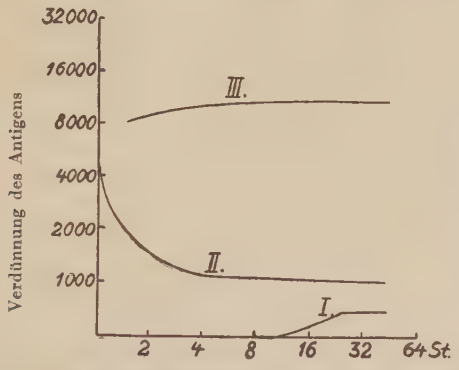
Zu bemerken ist ferner, dass es Lösungsmittel gibt, die zwar einen Teil des Forssman-Antigens aus den Stromata herauslösen, einen weiteren Teil nicht einmal bei Anwendung von Wärme und langer Versuchsdauer angreifen. Das gilt für Aether, Petroläther, iso-Propylalkohol, iso-Butylalkohol und Dioxan. Das würde bedeuten, dass das Forssman-Antigen in dem Stroma verschieden fest gebunden ist.

Da *Brunius* bei der Isolierung des Forssman-Antigens aus Organen wie Meerschweinchenniere etc. nach vorangehender Aceton-Extraktion mit Alkohol längere Zeit extrahiert und so das Forssman-Antigen in Lösung bringen kann, wurden diese beiden Lösungsmittel (Aceton und Alkohol) in einem Versuch über eine Zeit von 96 Stunden genauer studiert. Es wurden bei 20° C je 6 g Stromata mit 300 ccm Lösungsmittel unter Rühren extrahiert und zwar: 1. mit Aceton, 2. mit Alkohol, 3. nach der Aceton-Extraktion mit Alkohol. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen.

Abbildung 4.



A. Aceton-Extraktion von Hammelblut-Stromata B. Alkohol-Extraktion von Hammelblut-Stromata



C. Alkohol-Extraktion von Hammelblut-Stromata nach Aceton-Extraktion

I. Forssman-Antigen in den extrahierten Hammelblut-Stromata.
II. Mononukleose-Antigen in den extrahierten Hammelblut-Stromata.
III. Forssman-Antigen im Alkohol-Extrakt.

Die Abbildung 4 zeigt, dass durch Aceton-Extraktion keine starke Inaktivierung der Antigene eintritt (A). Der Extrakt ist inaktiv und enthält scheinbar inaktive Lipoide. In den alkoholischen Extrakten (B und C) findet man nur das Forssman-Antigen. In den Stromata ist eine deutliche Abnahme der Aktivität des Mononukleose-Antigens durch die Alkoholbehandlung festzustellen (B), ferner eine Restaktivität von Forssman-Antigen, das trotz der langen Versuchsdauer nicht restlos gelöst wurde. Bei der Alkohol-Extraktion nach Aceton-Extraktion (C) findet man dieselben Verhältnisse wie bei B. Nur ist hier (C) die Forssman-Extraktion eine vollkommene; nach 24 Stunden allerdings tritt wieder Forssman-Antigen in den restlichen Stromata auf, was als Ausfällung gedeutet werden kann. Die Acetonbehandlung scheint also für die restlose Extraktion des Forssman-Antigens notwendig zu sein.

Die quantitativen Verhältnisse bei der Extraktion liegen folgendermassen:

1. Bei der Aceton-Extraktion werden durchschnittlich 2,0 mg pro ccm Lösungsmittel extrahiert. Nach 4 Stunden ist bereits alles extrahiert, was löslich ist. Auf Stromata bezogen werden 10% in Aceton lösliche Substanzen entfernt.
2. Bei der Alkohol-Extraktion werden durchschnittlich 5,5 mg pro ccm Lösungsmittel extrahiert. Die Extraktion ist ebenfalls nach 4 Stunden vollständig. Auf Stromata bezogen werden 27,5% gelöst.
3. Bei der Alkohol-Extraktion nach vorangehender Aceton-Extraktion werden 3,5 mg pro Lösungsmittel extrahiert. Die Extraktion ist ebenfalls nach 4 Stunden vollständig, eher ist später eine Abnahme des Trockensubstanzgehaltes des Extraktes festzustellen. Auf Stromata bezogen werden 17,5% extrahiert.

Die Alkohol-Extraktion liefert also soviel (27,5%), wie die Summe aus Aceton-Extraktion (10%) und Alkohol-Extraktion nach Aceton-Extraktion (17,5%) beträgt.

Aus der Versuchsreihe lässt sich eine Methode zur Gewinnung des Forssman-Antigens aus Hammelblut-Stromata entwickeln, die analog der Methode von *Brunius* ist: Die Stromata werden nach vierstündiger Aceton-Extraktion weitere 4 Stunden mit Alkohol behandelt. Der alkoholische Extrakt enthält das Forssman-Antigen.

Bei weiteren Extraktionsversuchen wurde Phenol und Formamid, ferner Essigsäureanhydrid verwendet.

Tabelle 5.

		Aktivität			
		des Mononukleose-Antigens		des Forssman-Antigens	
Lösungsmittel	angew. Temp.	im unlösl. Rückstand	beim Verdünnen mit Wasser unlöslich.	im unlösl. Rückstand	beim Verdünnen mit Wasser unlöslich.
Phenol 88%	30°C	1: 750	1:1000	1: 250	1: 250
Phenol 5%	30°C	1:2000	———	I: 250	———
Formamid	30°C	1:2000	1:1000	1:2000	1:8000
Essigsäureanhydrid	90°C	0	0	0	0

Die Versuche, deren Resultat Tabelle 5 wiedergibt, wurden folgendermassen ausgeführt: Nach der Extraktion unter mechanischem Rühren, wie bereits beschrieben, wurde bei 15000 Umdrehungen/Minute abzentrifugiert (unlöslicher Rückstand), dann die Lösung in Wasser gegossen, wobei etwa das 10 fache Volumen verwendet wurde. Das in Wasser Unlösliche wurde abzentrifugiert. Bei der Extraktion mit Essigsäureanhydrid lässt sich aus der wässerigen Lösung durch Neutralisation eine weitere Fraktion gewinnen, die ebenfalls völlig inaktiv ist.

Aus Tabelle 5 geht hervor, dass keines der Reagenzien sich als Extraktionsmittel eignet, da die Inaktivierung der Antigene zu gross ist.

Extraktion von Hammelblut-Stromata mit wässrigen, anorganischen Salzlösungen.

Über die Extraktion bei verschiedenem pH mit Pufferlösungen und mit n/30 NaOH bzw .n/30 HCl haben *Tomcsik* und *Schwarzweiss* berichtet. n/30 HCl inaktiviert das Mononukleose-Antigen. Bei pH 7,1 und 9,25 war eine teilweise Extraktion zu verzeichnen. Mit n/30 NaOH konnte eine völlige Extraktion erreicht werden. Durch Neutralisation wurde das Mononukleose-Antigen wieder gefällt. Forssman-Antigen verhielt sich ähnlich, nur wurde es selbst mit n/30 HCl nicht inaktiviert.

Weitere Versuche wurden mit Bikarbonat verschiedener Konzentrationen und mit Antiformin durchgeführt.

Tabelle 6.

Lösungsmittel	angewandte Zeit	angewandte Temp.	Aktivität des Mononukleose-Antigens im unlösl. Rückstand	Aktivität des Mononukleose-Antigens nach Neutralisat. unlösl.	Aktivität des Forssman-Antigens im unlösl. Rückstand	Aktivität des Forssman-Antigens nach Neutralisat. unlösl.
$NaHCO_3$ 1 %	2 Std.	40°	1:10000	1:10000	1:6000	1: 3000
$NaHCO_3$ 2 %	2 Std.	40°	1: 2000	1: 8000	1:4000	1: 4000
$NaHCO_3$ 2,52%	2 Std.	40°	1:10000	1: 8000	1:4000	1: 2000
$NaHCO_3$ 4 %	2 Std.	40°	1: 6000	1: 2000	1:4000	1: 6000
$NaHCO_3$ 8 %	2 Std.	40°	1: 2000	1: 2000	1:8000	1:10000
$NaHCO_3$ 1 %	30'	60°	1:10000	1:10000	1:4000	1: 4000
Antiformin 1: 5	45'	20°	1: 500	1: 500	1:4000	1: 4000
Antiformin 1:10	15'	20°	1: 750	0	1:4000	1: 500
Antiformin 1:20	30'	20°	1: 3000	1: 1000	1:2000	1: 1000

Tabelle 6 zeigt, dass Bikarbonat nicht inaktiviert und nicht extrahiert, denn in allen Fraktionen ist die Aktivität etwa gleich. Bei 8% Bikarbonat macht sich bereits eine Inaktivierung auf das Mononukleose-Antigen bemerkbar. Antiformin wirkt bedeutend stärker inaktivierend als Bikarbonat.

Aus folgenden Gründen wurde eine Extraktion mit 2,52%igem Bikarbonat versucht: Mit 1,12%iger HCl konnte durch Neutralisation und nach Abfiltrieren des Niederschlages eine Lösung erhalten werden, deren Salzkonzentration der physiologischen entspricht. Die Lösung konnte serologisch untersucht werden und zeigte die Aktivität: 1:500 gegen Mononukleose-Serum, 0 gegen Forssman-Serum. Diese Angaben, die nicht in Tabelle 6 aufgenommen wurden, beziehen sich nicht auf Trockengewicht sondern auf die Anfangsverdünnung des Antigens. Die anderen Lösungen wurden aus technischen Gründen verworfen, da ohne Dialyse eine Einstellung auf physiologische Konzentration unmöglich ist.

Aus Tabelle 6 ist ersichtlich, dass Mononukleose- und Forssman-Antigen auf diese Art nicht zu separieren sind. Es scheint so, dass im «unlöslichen Rückstand» und in der Fraktion «nach Neutralisation unlöslich» die gleiche antigene Zusammensetzung vorhanden ist. Das würde bedeuten, dass der unlösliche Rückstand nach Extraktion nur unvollständig von der Lösung getrennt wurde, trotzdem eine Zentrifuge mit 15000 Umdrehungen/Minute verwendet wurde, d. h. die relativ kleinsten Teilchen werden nicht sedimentiert und ergeben dann die durch Neutralisation erhaltene Fraktion. Eine Abtrennung eines der Antigene vom Gesamtkomplex wurde nicht erreicht.

Zusammenfassung.

1. An Hand der Literatur wurde die chemische Konstitution der menschlichen A-Substanz, die dem Forssman-Antigen verwandt ist, erörtert, und ein neuer Polysaccharidverbindungstyp vermutet.
2. Die Methoden zur Herstellung von Stromata aus Erythrocyten (Jorpes'-sche und Sharples-Superzentrifugen-Methode) wurden diskutiert, Richtlinien zur Auswahl reiner Indikatoren d.h. von Forssman- und Mononukleose-Serum aufgestellt, und schliesslich eine Methode angegeben zur serologischen quantitativen Bestimmung des Forssman- und Mononukleose-Antigensmittels der Agglutinationshemmungstechnik.
3. Die Thermoresistenz der beiden Antigene wurde demonstriert und ihr Verhalten gegen eine Anzahl anorganischer und organischer Lösungsmittel untersucht. Die Extraktionsmöglichkeit von Hammelblut-Stromata mit Aceton und Alkohol wurde näher studiert, und eine Methode entwickelt, nach der man Forssman-Antigen aus Hammelblut-Stromata gewinnen kann. Eine Lösung des Mononukleose-Antigens wurde nicht erreicht.

Herrn Prof. Dr. J. Tomcsik möchte ich für die Anregungen und Unterstützung bei dieser Arbeit meinen aufrichtigsten Dank aussprechen, ferner der „Roche-Studien Stiftung", dank deren Hilfe die Arbeit ermöglicht wurde, und Herrn Prof. Dr. V. Demole für sein bekundetes Interesse.

Literaturangaben.

Boehm, G.; Biochem. Ztschr., *282.* 32 (1935).

Brahn, B. und *F. Schiff;* Klin. Wschr., 1926, 1455; 1929, 1523.

Brahn, B., F. Schiff und *F. Weinmann;* Klin. Wschr., 1932, 1592.

Brunius, F. E.; Chemikal studies on the true Forssman hapten etc., Stockholm, Aktiebolaget Fahlcrantz' Boktryckerie 1936.

Doerr, R. und *C. Hallauer;* Z. Immunit. Forsch., *47,* 291, (1926).

Doerr, R. und *R. Pick;* Biochem. Ztschr., *50,* 129 (1931).

Freudenberg, K. und *H. Eichel;* Ann. Chem. (Berlin), *510,* 240 (1934).

Freudenberg, K. und *H. Eichel* und *W. Dirscherl;* Naturwissenschaften, *20,* 657 (1932)

Freudenberg, K. und *O. Westphal;* Sitzungsberichte der Heidelberger Akademie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse 1938.

Friedberger, E. und *K. Suto;* Z. Immunit. Forsch., *28,* 217 (1919).

Friedenreich, V. und *S. With;* Z. Immunit. Forsch., *78,* 152 (1933).

Forssman, J.; Biochem. Ztschr., *37,* 78 (1911).

Georgi, W.; Arb. a. d. Inst. f. exper. Therapie u. d. Georg Speyerhaus, Frankfurt, H 9, 33 (1919).

Glanzmann, E. und *F. Ottensooser;* Schweiz, med. Wschr., 1935, 520.

Goebel, W. F.; J. exper. Med., 68, 221 (1938).

Hallauer, C.; Schweiz. med. Wschr., 1929, 121; Z. Immunit. Forsch., *76,* 119 (1932); *83,* 114 (1934).

Heidelderger, M. und *O. T. Avery;* J. exper. Med.. *38,* 73 (1923); *42,* 347 (1925).

Jorpes, E.; Biochem. J., *26,* 1488 (1932).

Jorpes, E. und *T. Tanning;* J. Immunol.. *51,* 215, 221 (1945).

Kabat, E. A., A Bendich, A. E. Bezer und *S. M. Beiser;* J. exper. Med., *85,* 685 (1947),

King, H. K. und *W. T. J. Morgan;* Biochem. J., *38,* (Proc.) (1944).

Landsteiner, K.; Biochem. Ztschr., *104,* 280 (1920); *119,* 294 (1921); Science, *76,* 351 (1932); J. exper. Med., *63,* 185 (1936).

Landsteiner, K. und *M. W. Chase;* J. exper. Med., *63,* 813 (1936).

Landsteiner, K. und *R. A. Harte;* J. exper. Med., *71,* 551 (1940).

Landsteiner, K. und *P. A. Levine;* J. Immunol.. *10,* 731 (1925); Proc. soc, exper. Biol.. *23,* 343 (1926); J. Immunol., *14,* 81 (1927).

Mueller, H. und *J. Tomcsik;* J. exper. Med., *40,* 343 (1924).

Pick, R.; Beitrag Chem. Physiol. u, Pathol., *1,* 397 (1902).

Oliver-Gonzalez, J.; J. inf. Dis., *74,* 81 (1944).

Ottensooser, F.; Z. Immunit. Forsch., *77,* 170 (1932).

Renaux, E. und *J. Thomas;* Ann. Inst. Pasteur, *68,* 31 (1942).

Sachs, H.; Weichhards Ergebnisse, *9,* 1 (1928); Handbuch d. normal. u. path. Phys., *13,* 405 (1929).

Sordelli, A., H. Fischer, R. Wernicke und *C. Pico;* Compt. rend. Soc. Biol., *84,* 173 (1921).

Schiff, F.; Klin. Wschr., 1924, 679.

Schiff, F. und *L. Adelsberger;* Z. Immunit. Forsch., *40,* 355 (1924).

Stuart, C. A., A. Griffin, K. M. Wheeler und *S. Battey;* Proc. soc. exper. Biol. a Med., *34,* 212 (1936).

Tomcsik, J; Schweiz. Z. f. Path. u. Bakt., 8, *345,* (1945).

Tomcsik, J. und *R. Fischer;* Schweiz. Z. f. Path. u. Bakt., *9,* 573 (1946)

Tomcsik, J. und *H. Schwarzweiss;* Schweiz, Z. f. Path. u. Bakt., *10,* 407 (1947).

Wells, H. G.; The chemical aspects of immunity, 1. Edit. New York 1924, deutsche Übersetzung: Die chemischen Anschauungen über Immunitätsvorgänge, Jena 1927.

Windaus, A. und *F. Knoop;* Ber. dtsch. chem. Ges., *38,* 1166 (1905).

Witebsky, E.; Z. Immunit. Forsch., *48,* 369 (1926); *49,* 1, 517 (1927).

Witebsky, E. und *N. C. Klendshoj;* J. exper. Med., *72,* 663 (1940).

Zinsser, H. und *J. T. Parker;* J. exper. Med., *27,* 275 (1923).